Archive of SID

نشریه فرآوری و نگهداری مواد غذایی
جلد هفتم، شماره دوم، ۹۴
۱-۱۶
http://ejfpp.gau.ac.ir

تأثیر امواج فراصوت و دی‌اکسید تیتانیوم بر *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیاکلی* در کشک مایع

فهیمه بابایی[۱]، جواد حصاری[۲*]، صفر فرج‌نیا[۳]، سیدعباس رافت[۴] و بهرام فتحی آچاچلویی[۵]

[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه تبریز، [۲]استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران، [۳]دانشیار گروه فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، [۴]دانشیار گروه دامپروری، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
[۵]استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

تاریخ دریافت: ۹۳/۰۳/۱۱ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۴/۰۷/۰۷

چکیده

سابقه و هدف: کشک از محصولات لبنی رایج در ایران است که مستعد آلودگی با انواع میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا است. امواج فراصوت به‌عنوان یک فرایند غیرحرارتی با تخریب غشای سلولی موجب اختلال در عملکرد میکروارگانیسم‌ها می‌شود اما معمولاً به‌تنهایی تأثیر شدیدی بر کاهش بار میکروبی ندارد. از این‌رو، هدف این تحقیق ترکیب امواج فراصوت با فرایند حرارتی و مواد ضدمیکروبی مانند دی‌اکسید تیتانیوم برای سالم‌سازی کشک مایع بود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش تاثیر امواج فراصوت قدرت (۱۳۰ وات، ۲۰ کیلوهرتز) و دی‌اکسید تیتانیوم بر غیرفعال‌سازی میکروارگانیسم‌های شاخص *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 29213) و *اشرشیاکلی* (DH 5-α) در کشک مایع بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد تابش امواج فراصوت در سه بازه زمانی (۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه) تأثیر معنی‌داری (P<۰/۰۵) بر کاهش جمعیت میکروبی داشت و با افزایش زمان تابش امواج، سرعت مرگ میکروارگانیسم‌ها کاهش یافت.

[*]مسئول مکاتبه: jhesari@tabrizu.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

افزایش توان امواج فراصوت سبب افزایش قدرت میکروب‌کشی آن‌ها شد. پس از ۱۵ دقیقه تابش امواج فراصوت (۱۳۰ وات، ۲۰ کیلوهرتز) بر روی نمونه‌های کشک، در حدود ۳ سیکل لگاریتمی از جمعیت *استافیلوکوکوس اورئوس* و ٤ سیکل لگاریتمی از جمعیت *اشرشیاکلی* کاسته شد. مقاومت باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* در برابر امواج فراصوت بیشتر از باکتری گرم منفی *اشرشیاکلی* بود. میکروارگانیسم‌هایی که پس از تابش امواج فراصوت قابلیت رشد داشته اما تضعیف شده بودند، با اعمال فرایند حرارتی ۵۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت نیم ساعت (۸ درجه پایین‌تر از دمای پاستوریزاسیون) از بین رفتند. افزودن دی‌اکسید تیتانیوم (۰/۰۳–۰/۰۵ درصد) تأثیر معنی‌داری بر افزایش توان میکروب‌کشی امواج فراصوت نداشت.

نتیجه‌گیری: از امواج فراصوت قدرت (۱۳۰ وات، ۲۰ کیلوهرتز به‌مدت ۱۵ دقیقه) در ترکیب با فرایند حرارتی ملایم (۵۵ درجه سانتی‌گراد، به‌مدت ۳۰ دقیقه) می‌توان برای سالم‌سازی کشک مایع بهره برد.

واژه‌های کلیدی: کشک، امواج فراصوت، دی‌اکسید تیتانیوم، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیاکلی*

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

امواج فراصوت، دسته‌ای از امواج فشاری هستند و هنگامی که خواص الاستیک از خود بروز می‌دهند (جامد، مایع یا گاز) قابلیت انتشار دارند. اصولاً امواج صوتی براساس بسامد به سه دسته عمده امواج فروصوت با بسامد پایین‌تر از ۲۰ هرتز، امواج صوتی قابل شنیدن توسط انسان با بسامد بین ۲۰ هرتز تا ۲۰ کیلوهرتز و امواج فراصوت با بسامد بیش از ۲۰ کیلوهرتز طبقه‌بندی می‌شوند و براساس بسامد و توان به دو گروه عمده فراصوت آنالیزی و فراصوت قدرت طبقه‌بندی شده‌اند. فراصوت آنالیزی شامل بسامدهای بالاتر از ۱۰۰ کیلوهرتز و توان کمتر از ۱ وات بر سانتی‌متر مربع است. این امواج قادر به تغییر ویژگی‌های شیمیایی و فیزیکی مواد نبوده و برای تعیین ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی غذاها و ساختار آن‌ها کاربرد دارند. امواج فراصوت قدرت دارای بسامد کمتر از ۱۰۰ کیلوهرتز و توان بیشتر از ۱ وات بر سانتی‌متر مربع هستند. پدیده کاویتاسیون توسط این امواج از طریق ایجاد شیب فشار و دما و نیز تولید نیروهای برشی شدید، قادر به تغییر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی غذاها شده و سبب کاهش بار میکروبی آن‌ها می‌گردد (۵).

امواج فراصوت قدرت می‌توانند گسیختگی‌هایی را در غشای میکروارگانیسم ایجاد نموده و با اختلال در عملکرد آن، از مقاومت حرارتی میکروارگانیسم بکاهند، اما به‌تنهایی، در دمای اتاق و در فشار جو تاثیر چندانی بر روی کاهش بار میکروبی ندارند. از این‌رو، ترکیب امواج فراصوت با فشار، حرارت و مواد ضدمیکروبی پیشنهاد شده است (١٤). استفاده از امواج فراصوت با فرکانس ۲۰ کیلوهرتز و دامنه ۱۱۷ میکرومتر در درجه حرارت‌های معمولی به‌تنهایی در نابود ساختن کارآمد نبوده و ترکیب آن با حرارت و فشار توصیه شده است (۱۳). هرچه توان امواج فراصوت افزایش یابد کارایی بیشتری در کاهش بار میکروبی حاصل می‌شود (۱۱).

مقاومت گونه‌های مختلف میکروارگانیسم‌ها نسبت به اولتراسونیکاسیون متفاوت است. باکتری‌های گرم منفی در برابر امواج فراصوت حساس‌تر از باکتری‌های گرم مثبت هستند (۱۸). دی‌اکسید تیتانیوم از جمله مواد شیمیایی است که به‌تنهایی خاصیت میکروب‌کشی نداشته و در برابر محرک‌هایی نظیر امواج فراصوت چنین ویژگی را از خود بروز می‌دهد. تابش امواج فراصوت موجب تولید رادیکال‌های هیدروکسیل و ذرات اکسنده‌ای نظیر پراکسید هیدروژن و اکسیدتیتانیوم در سطح ذرات دی‌اکسید تیتانیوم می‌گردد. اکسیدتیتانیوم ماده‌ای اکسنده است که از واکنش آب با تیتانیوم تولید می‌شود. تشکیل

www.SID.ir

Archive of SID

چنین گونه‌های اکسنده‌ای آغازگر یک سری واکنش‌های شیمیایی است که با افزایش توان اکسندگی، قدرت میکروب‌زدایی را افزایش می‌دهند (۸).

اشرشیاکلی نوعی باسیل گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه است و بطور شایع در روده جانوران خونگرم وجود دارد. انواعی از *اشرشیاکلی* که ایجاد اسهال می‌کنند پراکندگی زیادی دارند (۱۷). باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* کوکسی گرم مثبتی است که به‌صورت دوتایی، چهارتایی و خوشه‌ای بوده و از طریق تکثیر و انتشار گسترده در بافت‌ها و تولید مواد خارج سلولی ایجاد بیماری می‌کند.

تفاوت باکتری‌های گرم مثبت و منفی در دیواره سلولی آن‌ها است. پپتیدوگلیکان دیواره باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی ضخیم‌تر بوده و باعث مقاومت بیشتر باکتری‌های گرم مثبت می‌گردد (۱٤). کشک یکی از فرآورده‌های شیر است که به‌صورت مایع یا خمیری و خشک تهیه می‌شود. پایه و اساس کشک خشک از شیر است و از جوشانیدن، تغلیظ وخشک کردن ماست، دوغ و پسآب کره تخمیری به‌دست می‌آید. کشک خشک سنتی معمولاً در ایران از جوشانیدن ماست یا آب ماست و اضافه نمودن مقداری آرد گندم، نمک طعام و خشک کردن آن به اشکال مختلف تهیه می‌شود (۲). کشک مایع فرآورده‌ای است که از خیسانیدن کشک خشک و اضافه نمودن میزان معین آب و نمک طعام و سپس سائیدن آن با دستگاه‌های صنعتی و نیمه‌صنعتی تهیه گردیده و به‌وسیله حرارت مناسب سالم‌سازی شده و در ظروف مناسب بسته‌بندی می‌گردد (۱).

هدف از این پژوهش بررسی تأثیر امواج فراصوت (با توان‌های مختلف) و دی‌اکسید تیتانیوم بر کاهش مقاومت حرارتی و جمعیت میکروبی *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس‌اورئوس* و نیز تأثیر حجم سوسپانسیون میکروبی بر قدرت میکروب‌کشی امواج فراصوت در کشک مایع بود.

مواد و روش‌ها

مواد خام و شیمیایی مورد استفاده: کشک مورد استفاده از شرکت کامبیز و دی‌اکسید تیتانیوم به‌کار رفته از شرکت مرک آلمان تهیه شد.

www.SID.ir

Archive of SID

سویه‌های باکتری و محیط کشت: میکروارگانیسم‌های شاخص به‌کار رفته در این پژوهش شامل *اشرشیاکلی* (DH 5α) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 29213)[1] بودند. محیط‌های کشت بکار رفته نوترینت براث (شارلو، ساخت کشور اسپانیا) و نوترینت آگار (کیولب، ساخت کشور کانادا) بود.

آماده‌سازی نمونه: قبل از شروع آزمایش نمونه‌های کشک در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو (ریحان طب، ساخت کشور ایران) شدند تا پس از تلقیح فقط میکروارگانیسم‌های شاخص حضور داشته باشند. سپس نمونه‌های کشک به نسبت ۵۰:۵۰ با آب مقطر استریل رقیق شدند تا میکروارگانیسم‌ها به‌طور یکنواخت پخش شوند.

به منظور تهیه مایه کشت میکروبی، میکروارگانیسم‌های شاخص به‌مدت ٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در محیط کشت مربوطه گرم‌خانه‌گذاری شدند تا در زمان آزمایش تمامی میکروارگانیسم‌های موجود زنده بوده و اثر کشندگی امواج فراصوت به‌خوبی نمایان گردد. برای جداسازی میکروارگانیسم‌های شاخص از محیط کشت مربوطه، دوبار عمل شستشو و سانتریفوژ کردن (شیمی فن، مدل CE148) با سرعت ۱۰ هزار دور بر دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. سپس، جمعیت میکروبی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (unico، ساخت کشور آمریکا، مدل S2100,uv) و جدول استاندارد مک فارلند در حدود (10^8 cfu/ml) تنظیم شد، به‌طوری که در طول موج ٦۲۵ نانومتر میزان جذب نور از کووت حاوی باکتری در محدوده ۰/۱۳–۰/۰۸ قرار گرفت. کشت میکروبی تهیه شده نیز موید همین تعداد میکروارگانیسم بود. از سوسپانسیون میکروبی حاصل ۰/۵، ۳ و ۳۰ میلی‌لیتر به‌ترتیب با ٤/۵، ۲۷ و ۲۷۰ میلی‌لیتر کشک رقیق شده مخلوط گردید و جمعیت میکروبی به (10^7 cfu/ml) رسید. حجم نهایی نمونه‌های مورد آزمایش ۵، ۳۰ و ۳۰۰ میلی‌لیتر بودند (۱۰ و ۱۷).

فرایند فراصوت، اعمال حرارت و کشت میکروبی: با توجه به افزایش دما محیط آزمایش طی فرایند فراصوت، فالکون‌های حاوی ماده غذایی تلقیح شده جهت کنترل دما در آب و یخ قرار داده شدند و اثر کشندگ فقط ناشی از اعمال فرایند حرارتی انتهایی بود. فرایند فراصورت به‌صورت ۳۰ ثانیه اعمال تابش (در سه توان ۱۳۰، ۱۰۰ و ۷۰ وات) و ۳۰ ثانیه استراحت انجام گرفت (دستگاه فراصوت، ویبریا سل، توان ۱۳۰ وات و بسامد ۲۰ کیلوهرتز). پس از فرایند سونیکاسیون نمونه‌ها به‌مدت نیم ساعت در

1. American type culture collection

www.SID.ir

Archive of SID

دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس، حدود ۳۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های تیمار شده با فراصوت و حرارت دیده به‌طور مستقیم و بدون رقیق نمودن به پلیت‌های حاوی محیط کشت مربوطه انتقال و کشت میکروبی براساس استانداردهای شماره ۹۲۶۳ (۳) و ٦٨٠٦ (٤) انجام شد. باکتری *اشرشیاکلی* در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٢٤-١٢ ساعت و باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در همان دما به‌مدت ٤٨-٢٤ ساعت گرم‌خانه‌گذاری (پرشین طب، ساخت کشور ایران) شدند.

فرایند سونیکاسیون در حضور دی‌اکسید تیتانیوم: ابتدا ۰/۱ گرم دی‌اکسید تیتانیوم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل و سپس ۵۰ میلی‌لیتر از این محلول با ۵۰ میلی‌لیتر دوغاب کشک مخلوط شد و در نهایت غلظت دی‌اکسید تیتانیوم به ۰/۰۵ درصد رسید. مقدار ٤/٥ میلی‌لیتر از دوغاب کشک حاوی دی‌اکسید تیتانیوم با نیم میلی‌لیتر ازسوسپانسیون‌های میکروبی تهیه شده مخلوط گردید و پس از رسیدن جمعیت میکروبی نمونه‌ها به 10^{7} (cfu/ml)، به‌مدت ۱۵ دقیقه در برابر امواج فراصوت قرار گرفتند. حجم نمونه مورد آزمایش ۵ میلی‌لیتر بود.

تجزیه و تحلیل آماری

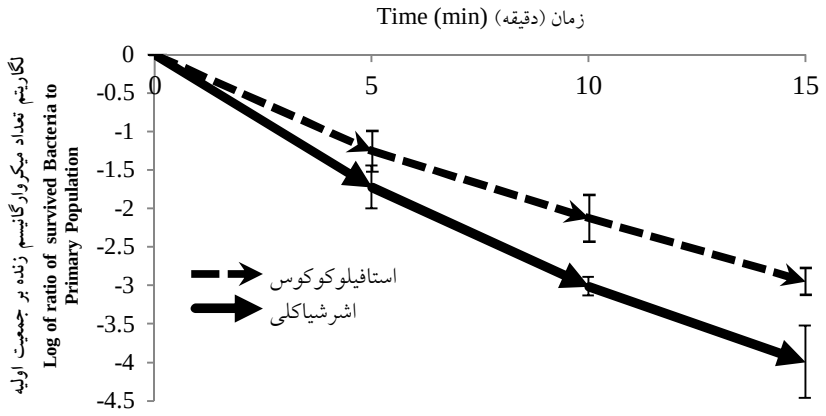
برای آزمودن تأثیرگذاری دی‌اکسید تیتانیوم بر توان میکروب‌کشی امواج فراصوت، از روش تی‌استیودنت و برای مقایسه کارایی امواج فراصوت در نابود ساختن باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت، بررسی تأثیر توان امواج فراصوت و حجم سوسپانسیون میکروبی بر قدرت میکروب‌کشی امواج فراصوت و نیز مقایسه شیب نمودار غیرفعال میکروارگانیسم‌ها در بازه‌های زمانی مختلف، از روش تحلیل واریانس یک‌طرفه استفاده شد. آزمایش‌ها در ۱۲ تکرار انجام شدند.

نتایج و بحث

تأثیر امواج فراصوت بر زنده مانی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی*: تعداد باکتری‌های زنده قبل و بعد از تابش امواج (۱۳۰ وات)، در نمونه‌های مورد آزمایش (۵ میلی‌لیتر) شمارش و با استفاده از داده‌های به‌دست آمده، منحنی زنده‌مانی میکروارگانیسم‌ها در برابر امواج فراصوت ترسیم شد (شکل ۱).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- تأثیر امواج فراصوت بر باکتری *استافیلوکوکوس‌اورئوس* (گرم مثبت) و *اشرشیا کلی* (گرم منفی).

Figure 1. Effect of ultrasound waves on *Staphylococcus aureus* (positive gram) and *Escherichia coli* (negative gram).

منحنی زنده‌مانی هر دو میکروارگانیسم از نوع درجه اول بود و با یافته‌های اینزهوآ و همکاران (۲۰۰۰) در مورد تخریب *اشرشیاکلی* با امواج فراصوت مطابقت داشت (۱۱). نتایج حاصل از آنالیز واریانس نشان داد اختلاف معنی‌داری بین شیب منحنی غیرفعال‌سازی میکروارگانیسم‌ها در سه بازه زمانی آزمایش (۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه) وجود دارد ($P<۰/۰۵$). شیب نمودار، شاخص غیرفعال‌سازی میکروارگانیسم توسط امواج فراصوت بود که با گذشت زمان از شیب نمودار کاسته شد. در حقیقت با گذشت زمان سرعت مرگ میکروارگانیسم کاهش یافت. در ابتدای فرایند که جمعیت میکروارگانیسم‌های زنده بالا بود فرایند به‌شکل کارآتری قادر به کاهش جمعیت میکروبی بود اما با گذشت زمان و افزایش جمعیت میکروارگانیسم‌های تخریب شده کارایی امواج پایین آمد.

شینوبو و همکاران (۲۰۰۹) نیز بر کاهش نرخ غیرفعال‌سازی میکروارگانیسم‌های *اشرشیاکلی* و *استرپتوکوکوس‌مانتوس* بر اثر گذشت زمان اشاره نمودند و اعلام داشتند در ده دقیقه اول نرخ غیرفعال‌سازی بالاتر بوده و با گذشت زمان به‌شدت از شیب نمودار کاسته شد. آن‌ها بیان نمودند از آن‌جا که جذب امواج فراصوت توسط سلول‌های خالی شده بسیار ناچیز است، کاهش بسیار سریع در نرخ غیرفعال‌سازی می‌تواند به‌دلیل تفاوت در بسامدهای کاویتاسیون باشد. پس، چنان‌چه تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌ها از بین روند، امکان دارد امواج فراصوت دوباره به‌شکل کاراتری ظاهر شوند (۱۷).

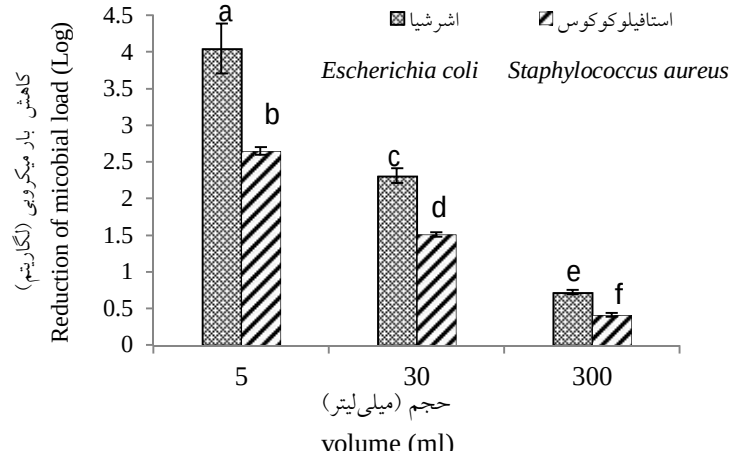
مقایسه تأثیر امواج فراصوت بر باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت: پس از ۱۵ دقیقه تابش امواج فراصوت با قدرت ۱۳۰ وات بر نمونه‌های حاوی ۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون میکروبی، در حدود ۳

www.SID.ir

Archive of SID

سیکل لگاریتمی از جمعیت *استافیلوکوکوس اورئوس* و ٤ سیکل لگاریتمی از جمعیت *اشرشیاکلی* کاسته شد. نمودارها و تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌های حاصل از پژوهش حاضر نشان داد میکروارگانیسم گرم منفی *اشرشیاکلی* حساس‌تر از باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس* اورئوس بود و بیشتر تخریب شد ($P<۰/۰۵$). در این باره نظرهای متفاوتی وجود دارد. احمد و همکاران (۱۹۷۵) بیان داشتند باکتری‌های گرم مثبت مقاوم‌تر از باکتری‌های گرم منفی هستند (٦)، در حالی‌که شربا و همکاران (۱۹۹۱) هیچ تفاوت معنی‌داری بین نرخ مرگ و میر میکروارگانیسم‌های گرم منفی (*اشرشیاکلی*) و گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس*) گزارش نکردند و بیان کردند محل اثر عامل تخریب کننده سلول، بیشتر سیتوپلاسم است تا غشا (۱۵). پس از چندین سال ویلیامیل و همکاران (۲۰۰۰) به بررسی تأثیر امواج فراصوت بر دو گونه باکتری گرم منفی (*سودوموناس فلوروسنس*) و گرم مثبت (*استرپتوکوکوس ترموفیلوس*) پرداختند. بدین‌منظور از سیستم اولتراسونیکی مداوم و پروب با قدرت ۱۵۰ وات و ۲۰ کیلوهرتز استفاده نمودند و دریافتند باکتری گرم منفی *سودوموناس فلوروسنس* حساس‌تر از باکتری گرم مثبت *استرپتوکوکوس* است (۱۸).

تأثیر حجم نمونه مورد آزمایش بر قدرت میکروب‌کشی امواج: شکل ۲ نشان‌دهنده کاهش جمعیت میکروارگانیسم‌های زنده پس از تابش امواج فراصوت (۱۳۰ وات، ۱۵ دقیقه) بر نمونه‌های حاوی ۵، ۳۰ و ۳۰۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون میکروبی است.



شکل ۲- تأثیر حجم سوسپانسیون میکروبی بر توانایی امواج فراصوت در کاهش بار میکروبی.

Figure 2. Effect of microbial suspension volume on germicidal effect of ultrasound waves.

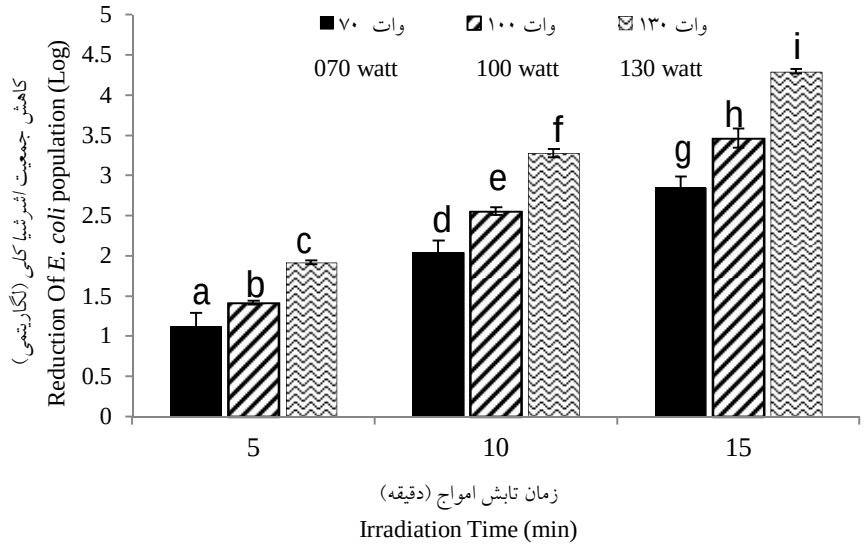
www.SID.ir

Archive of SID

با مقایسه نمودارها و نتایج به‌دست آمده از آنالیز واریانس می‌توان به اثر حجم سوسپانسیون میکروبی بر توان میکروب‌کشی امواج پی برد. هر چه حجم نمونه مورد آزمایش کمتر باشد، کارایی امواج در کاهش بار میکروبی افزایش می‌یابد.

اینزهوآ و همکاران (۲۰۰۰) امواج فراصوت (۱٤۰ وات و ۲۰ کیلوهرتز) را به‌مدت ۱۵ دقیقه بر ۳۰۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون میکروبی حاوی *اشرشیاکلی* تابانیده و موفق به کاهش یک سیکل لگاریتمی از جمعیت میکروبی شدند (۱۱)، اما در پژوهش حاضر با کاهش حجم سوسپانسون به ۵ میلی‌لیتر، امواج فراصوت با قدرت کمتر (۱۳۰ وات) در همان بسامد و زمان (۲۰ کیلوهرتز و ۱۵ دقیقه)، جمعیت *اشرشیاکلی* را به‌میزان ٤ سیکل لگاریتمی کاهش دادند.

تأثیر توان امواج فراصوت بر قدرت میکروب‌کشی امواج: شکل‌های ۳ و ٤ نشان‌دهنده کاهش جمعیت میکروارگانیسم‌های زنده پس از تابش امواج فراصوت با قدرت‌های مختلف (۷۰، ۱۰۰، ۱۳۰ وات) به‌مدت ۱۵ دقیقه بر نمونه‌های حاوی ۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون میکروبی است. نتایج حاصل از آنالیز واریانس نشان داد افزایش توان امواج فراصوت موجب افزایش قدرت میکروب‌کشی آن‌ها می‌گردد.

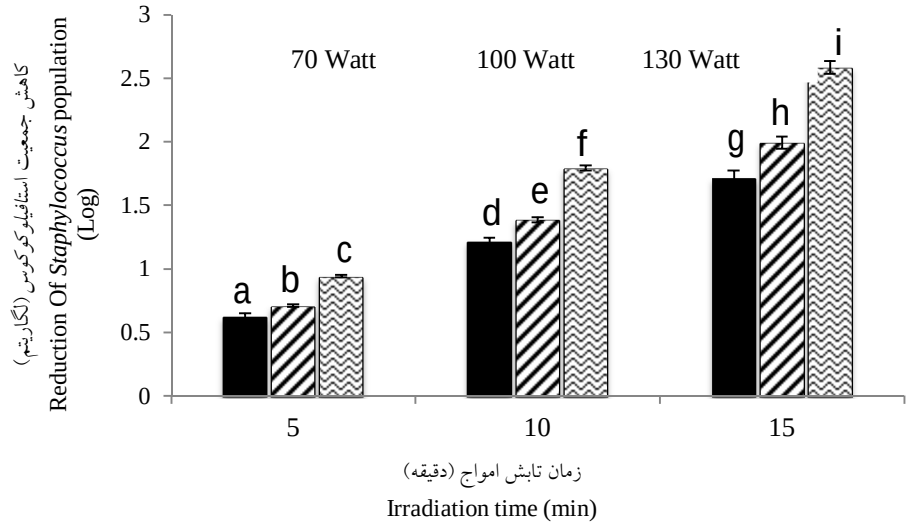


شکل ۳- تأثیر امواج فراصوت با توان‌های مختلف (۷۰، ۱۰۰، ۱۳۰ وات) بر کاهش جمعیت میکروبی *اشرشیاکلی*.

Figure 3. Effect of ultrasonic waves (70, 100, 130 W) on reduction of *Escherichia coli* population.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ٤- تأثیر امواج فراصوت با توان‌های مختلف (۷۰، ۱۰۰، ۱۳۰ وات) بر کاهش جمعیت میکروبی *استافیلوکوکوس اورئوس*.

Figure 4. Effect of ultrasonic waves (70, 100, 130 W) on reduction of *staphylococcus aureus* population

اینزهوآ و همکاران (۲۰۰۰) و شینوبو و همکاران (۲۰۰۹) نیز به نتایج مشابهی دست یافتند. آن‌ها امواج فراصوت را با توان‌های مختلف بر روی *اشرشیاکلی* و *استرپتوکوکوس مانتوس* آزموده و دریافتند افزایش توان امواج موجب افزایش کارایی آن‌ها در غیرفعال‌سازی میکروارگانیسم‌ها می‌گردد (۱۱ و ۱۷).

تأثیر امواج فراصوت و دی‌اکسید تیتانیوم بر زنده مانی *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس*: تعداد میکروارگانیسم‌های موجود در نمونه‌های کشک قبل از فرایند سونیکاسیون (۱۳۰ وات، ۱۵ دقیقه) و بعد از آن در نمونه‌های شاهد و حاوی دی‌اکسید تیتانیوم (۵ میلی‌لیتر) شمارش و لگاریتم آن‌ها در جدول ۱ درج گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- جمعیت باکتری‌های شاخص قبل و بعد از تابش امواج فراصوت در نمونه‌های کنترل و حاوی دی‌اکسید تیتانیوم (log cfu/ml).

Table 1. Indicator bacteria population before and after ultrasound wave's irradiation in control and Tio_2 containing samples. (logcfu/ml).

نمونه حاوی دی اکسیدتیتانیوم Titanium oxide sample	نمونه کنترل Control sample	قبل از فرایند Before treatment	جمعیت باکتری‌های شاخص Indicator bacteria population
5.018± 0.145[b]	5.02± 0.131[b]	6.67± 0.301 [a]	*استافیلوکوکوس اورئوس* *Staphylococcus aureus*
3.694± 0.185[b]	3.710± 0.181[b]	7.677± 0.22[a]	*اشرشیاکلی* *Escherichia coli*

a و b: حروف مشابه در هر سطر نشانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال خطای ۵ درصد است.

نتایج حاصل آزمون تی‌استودنت نشان داد حضور و یا عدم دی‌اکسید تیتانیوم (۰/۰۳-۰/۰۵ درصد) موجب تفاوت معنی‌داری در کاهش بار میکروبی توسط امواج فراصوت (۱۳۰ وات) نگردید (P>۰/۰۵). از آن‌جا که غلظت دی‌اکسید تیتانیوم بر خاصیت ضدمیکروبی آن تأثیر دارد، غلظت آستانه‌ای از دی‌اکسید تیتانیوم موردنیاز است تا با امواج فراصوت خاصیت هم‌افزایی داشته باشد. دادجور و همکاران (۲۰۰۵) در تحقیقی برروی باکتری *اشرشیاکلی* دریافتند تابش امواج فراصوت (۲۰۰ وات و ۳٦ کیلو هرتز) به‌مدت ۳۰ دقیقه موجب کاهش ۱۳ درصد از جمعیت میکروبی اولیه می‌گردد. در حالی که با حضور دانه‌های بر پایه رس دی‌اکسیدتیتانیوم، میزان کاهش میکروارگانیسم‌ها تا ۹۸ درصد می‌رسد. این امر نشان‌دهنده اثر هم‌افزایی امواج فراصوت و دی‌اکسید تیتانیوم است. این محققان؟ تأثیر غلظت‌های مختلف دی‌اکسید تیتانیوم را بر خاصیت میکروب کشی امواج مورد مطالعه قرار داده و نشان دادند غلظت دی‌اکسیدتیتانیوم به‌کار رفته در توان میکروب‌کشی امواج مؤثر است، به‌طوری که کاهش غلظت آن از ۲ به ۰/۵ گرم بر میلی‌لیتر، اثر سینرژیستی امواج فراصوت و دی‌اکسید تیتانیوم را تا ۸۰ درصد کاهش می‌دهد. از این‌رو، کاهش غلظت دی‌اکسید تیتانیوم به حدود کمتر از حد آستانه، موجب از بین رفتن اثرسینرژیستی آن با امواج فراصوت می‌گردد. البته دی‌اکسید تیتانیوم به‌تنهایی هیچ‌گونه خاصیت ضدمیکروبی نداشته و در حضور محرک‌هایی نظیر اشعه فرابنفش و یا فراصوت فعال شده و خاصیت ضدمیکروبی خود را نشان می‌دهد (۸).

دادجور و همکاران (۲۰۰٦) نیز تأثیر دی‌اکسید تیتانیوم (یک گرم بر میلی‌لیتر) را برروی سلول‌های *لژیونلا* بررسی نموده و دریافتند در حضور دی‌اکسید تیتانیوم، پس از ۳۰ دقیقه تابش فراصوت فقط ۳

www.SID.ir

Archive of SID

درصد از جمعیت میکروبی اولیه باقی‌مانده و ۹۷ درصد آن از بین می‌رود، در صورتی‌که فراصوت به‌تنهایی فقط قادر به کاهش ۱۸ درصد جمعیت میکروبی اولیه است. این محققان پیشنهاد نمودند احتمالاً تولید رادیکال‌های هیدروکسیل در سطح کریستال‌ها و یا حباب‌زایی غیرهمگون ناشی از ذرات دی‌اکسید تیتانیوم که موجب تشدید کاویتاسیون می‌گردد، تسریع کننده مرگ و میر میکروارگانیسم‌هاست (۹).

تأثیر فرایند حرارتی بعد از تابش امواج فراصوت: میکروارگانیسم‌هایی که پس از تیمار فراصوت (۱۳۰ وات، ۱۵ دقیقه، ۵ میلی‌لیتر) قابلیت رشد داشته، اما تضعیف شده بودند، با اعمال فرایند حرارتی ملایم‌تر (۵۵ درجه سانتی‌گراد، به‌مدت ۳۰ دقیقه) همگی از بین رفتند و در کشت میکروبی تهیه شده از آن‌ها، هیچ کلنی قابل مشاهده نبود. میکروارگانیسم‌هایی که فرایند سونیکاسیون بر روی آن‌ها انجام نشده بود (نمونه‌های کنترل) با حرارت ملایم‌تر (۸ درجه سانتی‌گراد پایین‌تر از دمای پاستوریزاسیون) از بین نرفتند و کلنی‌های قابل رشدی از هر دو باکتری مشاهده شد.

مقاومت گرمایی *باسیلوس سرئوس* و *باسیلوس لیچنی‌فورمیس*، نیز پس از اولتراسونیکاسیون در ۲۰ کیلوهرتز کاهش یافت (۷). اردونز و همکاران (۱۹۸٤) تأثیر همزمان فراصوت قدرت (۱٦۰ وات و ۲۰ کیلوهرتز) و فرایند حرارتی بر *استرپتوکوکوس دورانس* را بررسی کردند و دریافتند کاربرد همزمان فراصوت و حرارت بسیار مؤثرتر از کاربرد هر کدام به‌تنهایی است به‌طوری که همزمانی کاربرد این دو فرایند موجب افزایش مرگ و میر میکروارگانیسم‌ها به‌اندازه یک سیکل لگاریتمی می‌گردد (۱۲).

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد امواج فراصوت قدرت، قادر به نابود ساختن میکروارگانیسم‌ها بود و منحنی غیرفعال‌سازی هر دو باکتری از نوع درجه اول بود. مقاومت باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس‌اورئوس* در برابر امواج فراصوت بیش‌تر از باکتری گرم منفی *اشرشیاکلی* بود، اما هر دو باکتری پس از فرایند اولتراسونیکاسیون نسبت به حرارت حساس‌تر شدند. شیب منحنی غیرفعال‌سازی میکروارگانیسم‌ها در مراحل اولیه فرایند بیشتر بود. افزایش حجم نمونه‌های مورد آزمایش موجب کاهش تأثیرگذاری امواج فراصوت گردید. افزایش توان امواج فراصوت به‌کار رفته موجب افزایش قدرت میکروب‌کشی امواج شد.

www.SID.ir

Archive of SID

دی‌اکسید تیتانیوم در برابر محرک‌هایی نظیر امواج فراصوت فعال شده و خاصیت میکروب‌کشی خود را نشان می‌دهد. برای بروز چنین خاصیتی غلظت آستانه‌ای از دی‌اکسید تیتانیوم موردنیاز است، به‌طوری که غلظت به‌کار رفته در فراورده‌های لبنی (۰/۰۳-۰/۰۵ درصد) موجب افزایش توان میکروب‌کشی امواج فراصوت قدرت (۱۳۰ وات) نمی‌گردد.

منابع

1.Iranian National Standard Organization, 2001. Liquid Kashk–Specifications and test methods, Second Edition, No. 2452.

2.Iranian National Standard Organization, 2001. Dried kashk-Specification, First Edition, No. 2452.

3.Iranian National Standard Organization, 2001. Microbiology of food and animal feeding stuffs– Horizontal method for the enumeration of coliforms–Colony-count technique.

4.Iranian National Standard Organization, 2005. Microbiology of food and animal feeding stuffs– Enumeration of coagulase–Positive staphylococci (*staphylococcus aureus* and other species) – Test method, No. 6806.

5.Abbasi, S. and Gobadi, Z. 2009. Ultrasound: properties, production methods and its application in food processing. Journal of Natural Science and Agricultural Engineering. 24: 12-19.

6.Ahmed, F. and Russel, C. 1975. Synergism between ultrasonic waves and hydrogen peroxide in the killing of microorganisms. Journal of Applied Bacteriology. 39: 31-40.

7.Burgos, J. and Ordonez, J. 1972. Effect of ultrasonic waves on on the heat resistance of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis* spores. Journal of Applied Microbiology. 24: 497-498.

8.Dadjour, M.F., Ogino, C., Matsumura, S. and Shimizu, N. 2005. Kinetics of disinfection of *Escherichia coli* by catalytic ultrasonic irradiation with Tio2. Journal of Biochemical Engineering. 25: 243-248.

9.Dadjour, M.F., Ogino, C., Matsumura, S. and Shimizu, N. 2006. Disinfection of legionella pneumophila by ultrasonic treatment with Tio_2. Journal of water Research. 40: 1137-1142

10.Guerrero, S., Lopez-Malo, A. and Alzomora, S.M. 2001. Effect of ultrasound on the survival of *Saccharomyces cerevisiae*: influence of temperature, pH and amplitude. Journal of Innovative Food Science and Emerging Technologies. 2: 31-39.

11.Inez Hua, H. and Thompson, J. 2000. Inactivation of *E.coli* by sonication at distinct ultrasonic frequencies. Journal of Water Research. 34: 3888-3893.

www.SID.ir

Archive of SID

12. Ordonez, J.A., Sanz, B. and Hernandez, P.E. 1984. A note on the effect of combined ultrasonic and heat treatments on the survival of thermoduric streptococci. Journal of Applied Bacteriology. 54: 175-177.
13. Pagan, R. and Manas, P. 1999. Resistances of *Listeria monocytogenes* to ultrasonic waves under pressure at sub lethal (mano sonication) and lethal (manothermosonication) temperatures. Journal of Food Microbiology. 16: 139-148.
14. Piyasena, P. and Mohareb, E. 2003. Inactivation of microbes using ultrasound. Journal of Food Microbiology. 87: 207-216.
15. Scherba, G. and Weigel, R.M. 1991. Quantitative assessment of the germicidal efficacy of ultrasonic energy. Journal of Applied and Environmental Microbiology. 57: 2079–2084.
16. Shimizu, N. and Ninomiya, K. 2010. Potential uses of Titanium dioxide in conjunction with ultrasound for improved disinfection. Journal of Biochemical Engineering. 48: 416-423.
17. Shinobu, K. and Massika, M. 2009. Inactivation of *Escherchia coli* and *Streptococcus mantus* by ultrasound at 500 KHz. Journal of Ultrasonic Sonochemistery. 16: 655-659.
18. Villamiel, M. and De Jong, P. 2000. Inactivation of *Pseudomonas fluorescens* and *Streptococcus thermophilus* in trypticase soy broth and total bacteria in milk by continuous-flow ultrasonic treatment and conventional heating. Journal of Food Engineering. 45: 171-179.

www.SID.ir

Archive of SID

EJFPP, Vol. 7 (2): 1-16
http://ejfpp.gau.ac.ir

Effect of ultrasound waves and titanium dioxide on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in liquid Kashk

F. Babaii[1], J. Hesari[2]*, S. Farajnia[3], S.A. Rafat[4] and B. Fathi Achachiloyi[5]

[1]M.Sc. Student, Dept. of Food Science and Technology, University of Tabriz, Tabriz, Iran, [2]Professor, Dept. of Food Science and Technology, University of Tabriz, Tabriz, Iran, [3]Associate Prof., Dept. of Pharmacology, University of Medical Science of Tabriz, Tabriz, Iran, [4]Associate Prof., Dept. of Animal Science, University of Tabriz, Tabriz, Iran, [5]Assistant Prof., Dept. of Food Science and Technology, University of Mohagheg Ardabili, Ardabil, Iran.

Received: 2014/06/1; Accepted: 2015/09/29

Abstract

Background and objectives: Kashk is one of the common dairy products of Iran that is capable for contamination with pathogenic microorganisms. Ultrasonic waves with destroy effects on cellular membrane can be used for inactivation of microorganisms but it has limited effects when be used alone. So the aim of this project was combination of ultrasound and thermal treatments for processing of liquid Kashk.

Materials and methods: The effect of power ultrasound waves (130w, 20KHz) and titanium dioxide was investigated on *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) and *Escherichia coli (DH 5-α)* inactivation in liquid Kashk.

Results: The results indicated that population of indicator microorganisms decreased significantly (P<0.05) when they were exposed to ultrasound waves or 5, 10, 15 minutes. The rate of microbial in activation was decreased by irradiation time. Increasing the power of ultrasonic waves promoted germicidal effect of waves (P<0.05). After 15 minutes irradiation (130w, 20 KHz), a 3log reduction was achieved with respect to *Staphylococcus aureus* population, however in the case of *E. coli*, a 4 log reduction was observed at the same time. *Staphylococcus aureus* was more resistant than *Escherichia coli* to ultrasonic treatment. All survived microorganisms after ultrasonic treatment, were destroyed with a thermal

*Corresponding author; jhesari@tabrizu.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

processing in 55°C for 30 minutes. Results indicated that titanium dioxide addition (0/03-0/05%) had no effect on germicidal potency of ultrasound waves (P>0.05).

Conclusion: Finally, it was found that power ultrasonic waves in combination of Heat treatment can be used as an effective process for decontamination of Liquid Kashk.

Keywords: Kashk, Ultrasound waves, Titanium dioxide, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*

www.SID.ir